

INTRINSIC

1

(19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)

(12) Official Gazette for Laid-Open Patent Applications (A)

(11) Japanese Laid-Open Patent Application (Kokai) No. 6(1994)-303,990

(43) Date published: November 1, 1994

(51) Int.Cl.⁵

Ident. Symbols

Internal Office Nos.

C12P 21/08

8214-4B

C12N 5/20

15/06

8412-4B

9050-4B

FI

C12N 5/00

15/00

B

C

Continued on the last page

Request for Examination: Not yet requested

Number of Claims: 4 FD (Total of 5 pages)

(21) Application No.: 5(1983)-120,956

(22) Application Date: 24 April 1993

Application in accordance with Clause 1, Article 30 of the Patent Act; published in Nihon Men'Eki Gakkai Sokai Kiroku [Proceedings of the Japanese Society of Immunology], Vol. 22, published by the Japanese Society of Immunology on 30 October 1992

(71) Applicant:

000000952

Kanebo Company, Ltd.

17-4 Sumida 5-chome, Sumida-ku, Tokyo-to

(72) Inventor:

Kayo Nishida

21-6-907 Higashi Ikebukuro 2-chome

Toshima-ku, Tokyo-to

(72) Inventor:

Tadashi Nishida

21-6-907 Higashi Ikebukuro 2-chome

Translation of AL2

Toshima-ku, Tokyo-to

(72) Inventor: Kojin Hasunuma
10-101-702 Koyochonaka 1-chome
Higashi Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken

(72) Inventor: Chiyoko Sekine
6-36-604 Kiba 5-chome, Koto-ku
Tokyo-to

Continued on the last page

(54) [Title of the Invention] Monoclonal Antibodies, a Hybridoma that Produces Them and a Method for the Production of Said Antibodies

(57) [Abstract]

[Structure] Monoclonal antibodies that specifically recognize human integrin β_7 , a hybridoma that produces them and a method for the production of said antibodies.

[Effect] Human integrin β_7 in human tissues can easily be detected by using the monoclonal antibodies of this invention. In addition, human integrin β_7 can be separated and purified from human tissues by using the monoclonal antibodies of this invention. Consequently, the monoclonal antibodies of this invention are used as reagents for the detection of human integrin β_7 and as a reagent for separating and purifying it. Moreover, because the monoclonal antibodies of this invention control adhesion of B-cell lymphocytes (RPMI8866) to fibronectin, it is related to cell adhesion proteins such as fibronectin. Its application as a therapeutic agent for inflammatory diseases can be anticipated.

[Claims]

[Claim 1] Monoclonal antibodies that specifically recognize human integrin β_7 .

[Claim 2] A hybridoma that produces the antibodies described in Claim 1.

[Claim 3] A method for the production of monoclonal antibodies that specifically recognize human integrin β_7 characterized in that cells that express human integrin α_4 but that do not express human integrin β_1 are selected by the flow-cytometry analysis method from human lymphocytes selected from human memory T-cells, human monocytes and B-cell lymphoma using anti-human integrin α_4 antibodies and anti-human integrin β_1 antibodies, after which a solubilized solution of said cells is introduced into an immunoaffinity column in which anti-human integrin α_4 antibodies are immobilized, with a human integrin $\alpha_4 \beta_7$ heterodimer being obtained, which heterodimer is then used as an antigen to immunize a small mammal, after which its spleen is excised and antibody-producing spleen cells are prepared, said antibody producing spleen cells and myeloma cells then being subjected to cell fusion to prepare a hybridoma, monoclonal antibodies that said hybridoma produces being screened by flow-cytometry analysis, a hybridoma that does not recognize human integrin α_4 and that specifically recognizes integrin β_7 being selected, said hybridoma being injected intraperitoneally into small mammals that are compatible with it and the monoclonal antibodies that are produced from said ascites being separated and purified.

[Claim 4] A method for the production of monoclonal antibodies as described in Claim 3 in which the human B-cell lymphoma is RPMI8866.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of industrial application] This invention relates to monoclonal antibodies that specifically recognize human Integrin β_7 , a hybridoma that produces them and a method for the production of said antibodies.

[0002]

[Prior art] Integrin $\alpha_4 \beta_1$ (VLA-4) is expressed for the most part in monocytes. It infiltrates sites of inflammation through the agency of bonds with VCAM-1, which is a cell adhesion protein, and causes an inflammatory response. Consequently, impeding adhesion of VLA-4 and VCAM-1 is considered to be important in treatment in diseases such as asthma, allergies, arthritis and arteriosclerosis (M. Bosco and C. Chan, et al., J. Biol. Chem., Vol. 267, p. 8366, 1992).

[0003] VLA-4 belongs to the integrin β_1 subfamily and it is comprised of a heterodimer of integrin α_4 and integrin β_1 . However, it has been reported that the integrin α_4 subunit is associated not only with integrin β_1 , but also, in humans with integrin β_7 (M. Bosco, C. Chan et al., J. Biol. Chem., Vol. 267, p. 8366, 1992, and David J. Ertle et al., J. Biol. Chem., Vol. 266, p. 11009, 1991).

[0004] It has been reported that human integrin $\alpha_4 \beta_7$, like $\alpha_4 \beta_1$, causes adhesion of lymphocytes to endothelial cells through the agency of fibronectin and VCAM-1 (Curzio Ruegg, et al., J. Cell Biol., Vol. 117, p. 179, 1992).

[0005] Although various antibodies against integrin subunits are known, monoclonal antibodies against human integrin β_7 are not known.

[0006]

[Problems the invention is intended to solve] This invention has the objective of providing monoclonal antibodies that can bond specifically with integrin β_7 , a hybridoma that produces them and a method for the production of said antibodies.

[0007]

[Means for solving the problems] The inventors conducted various studies, and, as a result, perfected this invention by discovering monoclonal antibodies that specifically recognize human integrin β_7 and a hybridoma that produces monoclonal antibodies that specifically recognize human integrin β_7 .

[0008] We shall now present a detailed description of this invention.

[0009] The monoclonal antibodies of this invention and the hybridoma that produces them can be obtained by the following method of production.

(Preparation of antigen) In this invention, a purified hybridoma of human integrin $\alpha_4 \beta_7$ is used for the antigen that is employed for immunization of mammals.

[0010] The hybridoma of human integrin $\alpha_4 \beta_7$ can be obtained as described below.

[0011] First, cells that express human integrin α_4 but that do not express human integrin β_1 are selected by the flow-cytometry analysis method from human lymphocytes selected from human memory T-cells, human monocytes and B-cell lymphoma using anti-human integrin α_4 antibodies (SG/17, acquired from the Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shuntendo University) and anti-human integrin β_1 antibodies (SG/19, acquired from the Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shuntendo University) (it being thought that, with the cells that are selected, the human integrin α_4 subunit and the human integrin β_7 subunit form a heterodimer). Next, the selected cells are solubilized with a solubilizable buffer that contains a nonionic surfactant and are passed through an immunoaffinity column in which the anti-human integrin α_4 antibodies (SG/17) are immobilized, with a heterodimer of human integrin $\alpha_4 \beta_7$ being caused to adhere to said column, after which elution is performed with an acid, and a fraction containing the heterodimer of human integrin $\alpha_4 \beta_7$ is obtained. Finally, the fraction that has been obtained is dialyzed overnight in distilled water, after which it is freeze-dried.

[0012] RPMI8866 (acquired from the Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shuntendo University), which is a human B-cell lymphoma, is an example of cells that are selected by the aforementioned flow-cytometry method.

[0013] (Production of the hybridoma) The production of the hybridoma can be performed by a standard method as described below. Specifically, the freeze-dried product (antigen) of human integrin $\alpha_4 \beta_7$ that has been obtained as

described above is dissolved in a phosphate-buffered physiological saline solution and the solution is administered to a small mammal, such as a hamster, with said animal being immunized, after which its spleen is excised and antibody-producing spleen cells are prepared.

[0014] The antibody-producing spleen cells of the immunized animals are subjected to cell fusion with myeloma cells. The myeloma cells that are used may originate, for example, from mice. Cell fusion can be performed, for example, by the method of Milstein et al. (C. Milstein, et al., Nature, Vol. 256, p. 495, 1975). Specifically, it can be performed by reaction for approximately 1 to 3 minutes at 30°C to 40°C using 30% to 60% polyethylene glycol (average molecular weight of 1000 to 4000).

[0015] The monoclonal antibodies that are obtained in this way and that are produced by the hybridoma are screened by the flow-cytometry analytical method and a hybridoma that produces monoclonal antibodies that do not recognize human integrin α_4 and that specifically recognize human integrin β_7 are selected.

[0016] The hybridoma that was obtained as described above was designated as "a hybridoma producing anti-human integrin β_7 monoclonal antibody (TN114)." It was deposited in the Biological and Industrial Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology [Deposit No., Industrial Technology Institute Microorganism Deposit No. 13202 (FERM P-13202)].

[0017] (Production of monoclonal antibody) The monoclonal antibodies of this invention can be obtained by injecting the hybridoma that is obtained as described above intraperitoneally into a small animal that is compatible with it, for example, a hamster, in which it is caused to proliferate and by separating and purifying the monoclonal antibodies of this invention from the ascites by a standard method.

[0018] The monoclonal antibodies (TN114) of this invention are obtained by using the "hybridoma producing anti-human integrin β_7 monoclonal antibody (TN114)" as the hybridoma.

[0019]

[Effect of the invention] Human integrin β_7 in human tissues can easily be detected by using the monoclonal antibodies of this invention. In addition, human integrin β_7 can be separated and purified from human tissues by using the monoclonal antibodies of this invention. Consequently, the monoclonal antibodies of this invention can be employed as reagents for detecting human integrin β_7 and as reagents for its separation and purification.

[0020] The monoclonal antibodies (TN114) of this invention control adhesion of human B-cell lymphoma (RPMI8866) to fibronectin (see Experimental Example 1), for which reason it is anticipated that they can be used as treatment agents for inflammatory diseases that are related to cell adhesion proteins such as fibronectin.

[0021] Experimental Example 1

Inhibitory action on adhesion of human B-cell lymphoma (RPMI8866) to fibronectin by means of anti-human integrin β_7 monoclonal antibodies:

(1) Test sample

Monoclonal antibodies of this invention (TN114; see Example 2)

[0022] (2) Experimental method

10 μ g/ml human plasma fibronectin (manufactured by GIBCO) dissolved in 50 μ l of phosphate-buffered physiological saline solution (pH 7.4, abbreviated hereafter as PBS) was poured individually into each well of a 96-well microtiter plate and the materials were cultured at 4°C. The solution in each well was removed and washed in PBS, after which blocking was performed for 2 hours with PBS containing 1% bovine serum albumin. Following that, it was washed 3 times with PBS and the bovine serum albumin was removed.

[0023] Further, the human B-cell lymphoma (RPMI8866) was cultured for 30 minutes together with a dimethyl sulfoxide solution (manufactured by Dojin Chemicals) of 10 μ M 2',7'-bis(carboxyethyl)carboxyfluorescein tetraacetatoxy methyl ester (hereafter abbreviated as BCECF-AM), after which it was washed three times with serum-free lymphocyte culture medium (AIM VTM culture medium manufactured by GIBCO). The human B-cell lymphoma (RPMI8866) in which BCECF-AM was incorporated that was obtained and the test sample were subjected to preliminary culture for 30 minutes, after which the sample was

poured individually into the wells of the aforementioned 96-well microtiter plate (1×10^5 of said cells per well; sample concentration: 20 $\mu\text{g/ml}$). The materials were cultured for 10 minutes at 37°C, after which each well was filled with PBS and was hermetically sealed with plate seal (manufactured by the Dainippon Pharmaceutical Company). Said plate was inverted and centrifugation was performed for 2 minutes at 800 rotations/minute. The solution in each well was removed, after which 100 μl of 1% Nonidet P-40TM (manufactured by Kanaraitech*) were added and the cells remaining due to adhesion were dissolved. Next, the quantity of BCECF-AM in each well was determined using a fluoroscanner and the adhesion rate of the human B-cell lymphoma (RPMI8866) to the fibronectin was found taking this quantity as the index. The adhesion rate was calculated taking fluorescence intensity when the aforementioned experiment was conducted using a well not coated with fibronectin as 0% and taking the fluorescence intensity when human B-cell lymphoma (RPMI8866) (1×10^5 cells) in which the aforementioned BCECF-AM was incorporated was dissolved in 100 μl of 1% Nonidet P-40TM as 100%.

[0024] As a controls, the adhesion rates when anti-human integrin β_1 antibodies (SG/19), and anti-human integrin α_4 antibodies (SG/73, acquired from the Department of Immunology, Faculty of Immunology, Shuntendo University) were added and when antibodies were not added were found in the same way as described above.

* Phonetic transliteration of company name—Trans. note.

[0025] (3) Experimental Results

The results are shown in Figure 1. As should be evident from Figure 1, it was ascertained that the monoclonal antibodies inhibit adhesion of human B-cell lymphoma (RPMI8866) to fibronectin.

[0026]

[Examples] We shall now describe this invention by presenting examples.

[0027] In the examples, culture media (1) through (3) indicated below were used, depending on the objectives.

(1) RPM11640 culture medium

(2) Culture medium for cells (myeloma cells or hybridoma)

A culture medium obtained by adding the substances indicated below to culture medium (1) as described above

10% fetal calf serum

2mM L-glutamine

50 μ M 2-mercaptoethanol

100 U/ml penicillin G

100 μ g/ml streptomycin

20 mM sodium hydrogen carbonate

(3) HAT culture medium

A culture medium obtained by adding the following substances to culture medium

(2) as described above

0.1 mM hypoxanthine

0.4 μ M aminopterin

16 μ M thymidine

[0028] Example 1

Hybridoma that produces monoclonal antibodies that specifically recognize human integrin β_7 .

(Preparation of antigen) Various human lymphocytes (6×10^5 cells) were divided into three groups and each group was suspended in 50 μ l of PBS. Anti-human integrin α_4 antibodies (SG/17) were added to one of these groups, anti-human integrin β_1 antibodies (SG/19) were added to another of these groups and nothing was added to the remaining group. These materials were cultured for 30 minutes at 4°C. After culture, they were washed with PBS, after which they were suspended in 50 μ l of PBS containing 0.5 μ l of goat anti-mouse IgG-FITC (manufactured by Olympus). Next, they were again cultured for 30 minutes at 4°C and were then washed with PBS, after which they were again suspended in 200 μ l of PBS. Each suspension was analyzed by flow cytometry, cells that

expressed human integrin α_4 and that did not express human integrin β_1 were selected and RPMI8866, which is a human B-cell lymphoma, was obtained.

[0029] The RPMI8866 (3×10^8 cells) that was obtained was solubilized with 30 ml of solubilization buffer [50 mM tris-hydrochloric acid, pH 7.6, 150 mM sodium chloride, 1% polyoxyethylene (10) octylphenyl ether, 50 mM iodoacetamide, 2 mM magnesium chloride, 2 mM calcium chloride, 0.1% sodium azide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] and was adsorbed to an immunoaffinity column in which anti-human integrin α_4 antibodies (SG/17) were bonded to cellulose beads. Next, it was eluted with 0.1 N glycine-hydrochloric acid buffer (pH 3.0) and a fraction containing a heterodimer of human integrin $\alpha_4 \beta_7$ was obtained. The fraction that was obtained was dialyzed overnight in distilled water, after which it was freeze dried (yield, 10 μ g). Said freeze-fried product was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the presence of human integrin $\alpha_4 \beta_7$ was confirmed at 120-150 kDa.

[0030] (Production of hybridoma) 10 μ g of the freeze-dried product of the $\alpha_4 \beta_7$ heterodimer that was obtained as described above were suspended in 0.5 ml of PBS and Armenian hamsters were immunized by a 5x intraperitoneal injection at intervals of 1 to 2 weeks.

[0031] The spleen of the hamster was excised four days after the final immunization and antibody-producing spleen cells were prepared. Next, said spleen cells and mouse myeloma cells P3 x 63Ag8U.1 (ATCC CRL 1597) were mixed in a ratio of 5 : 1 and cell fusion was effected by reacting them for 2

minutes at 37°C using 50% polyethylene glycol (average molecular weight, 4000).

[0032] Cells that had undergone cell fusion were implanted in a 96-well microtiter plate and were cultured in HAT culture medium for 7 to 14 days at 37°C and in the presence of 5% carbon dioxide.

[0033] Next, the culture supernatant of implanted cells was screened by flow-cytometry analysis. The details of the flow-cytometry analysis method are described below.

[0034] 160 μ l of human integrin β_7 hybridoma culture supernatant were divided into two parts. Half was cultured with 2×10^5 RPMI8866 cells and the remaining half was cultured with 2×10^5 Ramos cells (ATCC CRL 1596), with culture being performed for 30 minutes at 4°C. The cells were washed with PBS, after which the cells were resuspended for 30 minutes at 4°C in 50 μ l of cell culture medium containing 0.5 μ l of goat anti-hamster-IgG-FITC (manufactured by CALTAG) and were again washed with PBS. These cells were then resuspended in 200 μ l of cell culture medium and were analyzed by flow cytometry.

[0035] As a result, it was ascertained that the four clones exhibited positive responses to the target antigens.

[0036] The four clones that were obtained in the aforementioned screening process were prepared in amounts of 1/0.2 ml in cell culture medium

containing thymus cells (approximately 1×10^6 cells/ml) of BALB/c mice and were implanted in individual wells of a 96-well microtiter plate. Culture was performed at 37°C in the presence of carbon dioxide, after which colonies that could be discerned with the unaided eye were formed in 7 to 14 days. The colonies that were obtained were screened and cloned in the same way as described above, and, finally, confirmation procedures were performed by Western blotting using rabbit antiserum to β_7 peptides (acquired from Dr. Michael B. Brenner of Harvard Medical School in the United States), with a single clone strain that specifically recognizes human integrin β_7 being obtained (staining being found in the site of the 120 kD β -chain).

[0037] The single strain that was obtained was designated as "hybridoma producing anti-human integrin β_7 monoclonal antibody (TN114)" and was deposited in the Biological and Industrial Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology [Deposit No., Industrial Technology Institute Microorganism Deposit No. 13202 (FERM P-13202)].

[0038] Example 2

Monoclonal antibodies that specifically recognize human integrin β_7 : The hybridoma producing anti-human integrin β_7 monoclonal antibody (TN114) (1×10^7 cells) obtained in Example 1 are inoculated intraperitoneally into BALB/c mice (3 animals) that had been given intraperitoneal administrations of 0.5 ml of 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (manufactured by Nakarai Tesuku) in

advance. After about 1 week, ascites (approximately 3 ml/mouse) containing hamster anti-human integrin β_7 monoclonal antibodies (TN114) was obtained.

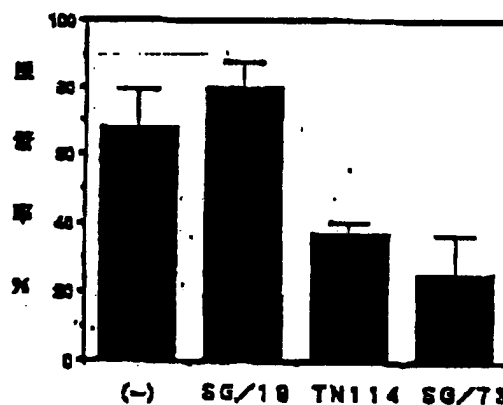
[0039] Next, 20 ml of PBS were added to approximately 10 ml of the ascites that was obtained and dialysis was carried out overnight with PBS at 4°C. This was passed through a 0.2- μ m filter, after which separation and purification were carried out with a protein G Sepharose 4-fast flow column (manufactured by Pharmacia). Dialysis was again performed overnight with PBS at 4°C, with 5 ml of PBS solution of hamster anti-human integrin β_7 monoclonal antibodies (TN114) being obtained (concentration: 100 μ g/ml).

[Brief Explanation of the Figure]

[Figure 1] This is a figure showing that the monoclonal antibodies (TN114) of this invention inhibit adhesion of human B-cell lymphoma (RPMI8866) to fibronectin.

[Figure 1]

[y-axis]: Adhesion rate %



[below line]

Continued from front page

(51) Int.Cl. ⁵	Ident. Symbols	Internal Office Nos. FI
// (C12P 21/08 C12R 1:91) (C12N 5/20) C12R 1: 91)		

(72) Inventor: Hideo Yagita
9-2-610 Ozusawa 3-chome, Itabashi-ku
Tokyo-to

(72) Inventor: Yasushi Okumura
14-9 Matsunami 1-chome, Chuo-ku
Chiba-shi, Chiba-ken

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-303990

(43)公開日 平成6年(1994)11月1日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12P 21/08

8214-4B

C12N 5/20

15/06

8412-4B

C12N 5/00

B

9050-4B

15/00

C

審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全5頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平5-120956

(22)出願日

平成5年(1993)4月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月30日、
日本免疫学会は発行の「日本免疫学会総会記録第22巻」
に発表

(71)出願人 000000952

鐘紡株式会社

東京都墨田区墨田五丁目17番4号

(72)発明者 西田 佳代

東京都豊島区東池袋2丁目21番6-907号

(72)発明者 西田 正

東京都豊島区東池袋2丁目21番6-907号

(72)発明者 蓮沼 行人

兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番

101-702号

(72)発明者 関根 知世子

東京都江東区木場5丁目6番36-604号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法

(57)【要約】

【構成】 ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法。

【効果】 本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中のヒトインテグリン β_7 を容易に検出することができる。また、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中からヒトインテグリン β_7 を分離精製することができる。従って、本発明のモノクローナル抗体はヒトインテグリン β_7 の検出試薬や分離精製用試薬として有用である。更に、本発明のモノクローナル抗体はヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することから、フィブロネクチン等の細胞接着蛋白と関連する、炎症性疾患の治療薬としての応用が期待される。

AL2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項2】 請求項1に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】 抗ヒトインテグリン α_4 抗体と抗ヒトインテグリン β_1 抗体とを用いて、ヒトメモリーT細胞、ヒト単球およびヒトB細胞リンパ腫のなかから選択されるヒトリンパ細胞から、フローサイトメトリー分析法により、ヒトインテグリン α_4 を発現しているがヒトインテグリン β_1 を発現していない細胞を選出した後、該細胞の可溶化溶液を抗ヒトインテグリン α_4 抗体を固定化したイムノアフィニティカラムに付してヒトインテグリン $\alpha_4 \beta_1$ のヘテロダイマーを得、次にこれを抗原として哺乳小動物を免疫した後、その脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製し、該抗体産生脾細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合してハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をフローサイトメトリー分析法によりスクリーニングしてヒトインテグリン α_4 を認識せずにヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマを、これと適合性のある哺乳小動物の腹腔内に接種して増殖させ、該腹水から生成したモノクローナル抗体を分離精製することを特徴とするヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 ヒトB細胞リンパ腫がRPMI 8866である請求項3に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】インテグリン $\alpha_4 \beta_1$ (VLA-4) は単核白血球の大部分に発現しており、細胞接着蛋白の一つであるVCAM-1との結合を介して炎症部位に浸潤し、炎症反応を起こす。従って、喘息、アレルギー、関節炎および動脈硬化症のような疾患においては、VLA-4とVCAM-1との接着を阻害することが治療上重要であると考えられている(Bosco M. C. Chanら、J. Biol. Chem.、第267巻、8366頁、1992年)。

【0003】VLA-4はインテグリン β_1 サブファミリーに属し、その構成はインテグリン α_4 とインテグリン β_1 のヘテロダイマーから成る。しかし、このインテグリン α_4 サブユニットはインテグリン β_1 のみならず、ヒトではインテグリン β_7 とも会合することが報告されている(Bosco M. C. Chanら、J. Biol. Chem.、第267巻、8366頁、1992年およびDavid J. Erleら、J. B

iol. Chem.、第266巻、11009頁、1991年)。

【0004】ヒトインテグリン $\alpha_4 \beta_7$ はヒトインテグリン $\alpha_4 \beta_1$ と同様、フィブロネクチンやVCAM-1を介して内皮細胞にリンパ球を接着させるという報告もある(Curzio Rueggら、J. Cell Biol.、第117巻、179頁、1992年)。

【0005】従来、インテグリンサブユニットに対する種々の抗体が知られているが、ヒトインテグリン β_7 に対するモノクローナル抗体は、知られていなかった。

10 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はヒトインテグリン β_7 と特異的に結合できるモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、種々検討した結果、ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体およびヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを見だし、本発明を完成させた。

20

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】本発明のモノクローナル抗体およびそれを産生するハイブリドーマは、以下の製造方法によって得ることができる。

(抗原の調製)本発明では、哺乳動物への免疫に用いる抗原には、精製したヒトインテグリン $\alpha_4 \beta_7$ のヘテロダイマーを用いる。

【0010】ヒトインテグリン $\alpha_4 \beta_7$ のヘテロダイマーは、以下のようにして得ることができる。

30

【0011】先ず、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/17、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)と抗ヒトインテグリン β_1 抗体(SG/19、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)とを用いて、ヒトメモリーT細胞、ヒト単球およびヒトB細胞リンパ腫のなかから選択されるヒトリンパ細胞から、フローサイトメトリー分析法により、ヒトインテグリン α_4 を発現しているがヒトインテグリン β_1 を発現していない細胞を選出する(選出された細胞は、ヒトインテグリン α_4 サブユニットとヒトインテグリン β_7 サブユニットとがヘテロダイマーを構成していると考えられる)。次いで、選出された細胞を非イオン性の界面活性剤が含まれる可溶化バッファーで可溶化し、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/17)を固定化したイムノアフィニティカラムに通してヒトインテグリン $\alpha_4 \beta_7$ のヘテロダイマーを該カラムに吸着させた後、酸で溶出し、ヒトインテグリン $\alpha_4 \beta_7$ のヘテロダイマーを含む画分を得る。最後に、得られた画分を蒸留水にて一夜透析した後、凍結乾燥する。

40

【0012】上記のフローサイトメトリー分析法によって選出された細胞としては、ヒトB細胞リンパ腫であるRPMI 8866(順天堂大学医学部免疫学教室から入

50

手)が例示される。

【0013】(ハイブリドーマの製造)ハイブリドーマの製造は、常法に従って次のようにして行うことができる。即ち、上記のようにして得られるヒトインテグリン $\alpha_4\beta_7$ の凍結乾燥品(抗原)をリン酸緩衝生理食塩液に溶解し、これをハムスター等の哺乳小動物に投与して該動物を免疫した後、その脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製する。

【0014】免疫された動物の抗体産生脾細胞は骨髓腫細胞と細胞融合されるが、用いる骨髓腫細胞は、例えば、マウス由来のものが好ましい。細胞融合は、例えば、ミルステインらの方法(C. Milstein ら、Nature、第256 巻、495 頁、1975年)に準じて行われる。即ち、30%~60%ポリエチレングリコール(平均分子量1000~4000)を用いて30℃~40℃の温度で約1~3分反応させることによって行われる。

【0015】このようにして得られるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を、フローサイトメトリー分析法によりスクリーニングを行い、ヒトインテグリン α_4 を認識せずにヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別する。

【0016】上記により得られたハイブリドーマは、「抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した[受託番号、微工研菌寄第13202号(FERM P-13202)]。

【0017】(モノクローナル抗体の製造)本発明のモノクローナル抗体は、上記により得られるハイブリドーマを、これと適合性のある哺乳小動物、例えば、マウス等の腹腔内に接種し、増殖させ、その腹水から本発明のモノクローナル抗体を常法により分離精製することによって得られる。

【0018】ハイブリドーマとして「抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」を用いることにより、本発明のモノクローナル抗体(TN114)が得られる。

【0019】

【発明の作用効果】本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中のヒトインテグリン β_7 を容易に検出することができる。また、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中からヒトインテグリン β_7 を分離精製することができる。従って、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトインテグリン β_7 の検出試薬や分離精製用試薬として有用である。

【0020】更に、本発明のモノクローナル抗体(TN114)はヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することから(試験例1参照)、フィブロネクチン等の細胞接着蛋白と関連する、炎症性疾患の治療薬としての応用が期待され

る。

【0021】試験例1

抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体による、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着の抑制作用:

(1)検体

・本発明のモノクローナル抗体(TN114、実施例2参照)

【0022】(2)試験方法

96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに、リン酸緩衝生理食塩液(pH7.4、以下PBSと略記する)に溶解したヒト血漿フィブロネクチン(GIBCO製)10 μ g/mlを50 μ lずつ分注し、4℃で一夜培養した。各ウエルの溶液を除去し、PBSで洗浄後、1%ウシ血清アルブミンを含有するPBSで2時間ブロッキングを行った。その後、PBSで3回洗浄し、ウシ血清アルブミンを除去した。

【0023】他方、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)を10 μ Mの2',7'-ビス(カルボキシエチル)カルボキシフルオレセインテトラアセトキシメチルエステル(以下BCECF-AMと略記する)のジメチルスルホキシド溶液(同仁化学製)と共に30分間培養した後、無血清リンパ球培地(AIM V™培地、GIBCO製)で3回洗浄した。得られたBCECF-AMを取り込ませたヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)と検体とを予め30分間培養後、先の96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに分注した(各ウエル当たり、該細胞:1 \times 10⁵個、検体濃度:20 μ g/ml)。37℃で10分間培養した後、各ウエルをPBSで満たし、プレートシール(大日本製薬製)で密閉した。該プレートを逆さにして800回転/分で2分間遠心回転を行った。各ウエルの溶液を除去した後、1%ノニデットP-40™(ナカライテスク製)を100 μ l加え、接着によって残っている細胞を溶解させた。次いで、各ウエル中のBCECF-AM量をフルオロスキヤンを用いて測定し、これを指標にしてヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着率を求めた。接着率は、フィブロネクチンをコートしていないウエルを用いて上記試験を行った場合の蛍光強度を0%とし、上記におけるBCECF-AMを取り込ませたヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)(1 \times 10⁵個)を1%ノニデットP-40™100 μ lに溶解させた場合の蛍光強度を100%として算出した。

【0024】なお、対照として、抗ヒトインテグリン β_7 抗体(SG/19)、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/73、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)および抗体非添加の場合における接着率も上記と同様に求めた。

【0025】(3)試験結果

結果を図1に示した。図1から明らかなように、本発明

のモノクローナル抗体は、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI 8866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することが判明した。

【0026】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明する。

【0027】なお、実施例においては、以下の①-③の培地を目的に応じて使用した。

①RPMI 1640培地

②細胞(骨髓腫細胞またはハイブリドーマ)用培地
上記①の培地に以下のものを添加した培地

10% ウシ胎児血清

2mM L-グルタミン

50 μ M 2-メルカプトエタノール

100 U/ml ペニシリンG

100 μ g/ml ストレプトマイシン

20mM 炭酸水素ナトリウム

③HAT培地

上記②の培地に更に、以下のものを添加した培地

0.1 mM ヒポキサンチン

0.4 μ M アミノプテリン

16 μ M チミジン

【0028】実施例1

ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:

(抗原の調製)種々のヒトリンパ細胞(6×10^5 個)を三分し、夫々50 μ lのPBSに懸濁した。そのうちの1つには抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/17)を、もう1つには抗ヒトインテグリン β_1 抗体(SG/19)を夫々1 μ gずつ添加し、残り1つには何も添加せず、それらを4℃で30分間培養した。培養後、夫々をPBSで洗浄した後、ヤギ抗マウスIgG-FITC(オリンパス製)0.5 μ lを含有するPBS50 μ lに懸濁した。次いで、再度4℃で30分間培養し、PBSで洗浄した後、それらをPBS 200 μ lに再懸濁した。各懸濁液をフローサイトメトリーにより分析し、ヒトインテグリン α_4 を発現しているがヒトインテグリン β_1 を発現していない細胞を選出し、ヒトB細胞リンパ腫であるRPMI 8866を得た。

【0029】得られたRPMI 8866(3×10^8 個)を可溶化バッファー[50mMトリス-塩酸、pH 7.6、150 mM塩化ナトリウム、1%ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、50mMヨードアセトアミド、2mM塩化マグネシウム、2mM塩化カルシウム、0.1%アジ化ナトリウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホン]30mlにより可溶化し、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/17)をセファロースビーズに結合させたイムノアフィニティカラムに吸着させた。次いで、0.1 Mグリシン-塩酸バッファー(pH 3.0)で溶出し、ヒトインテグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを含む画分を得た。得られた画分を、蒸留水にて一夜透析した後、凍

結乾燥させた(収量10 μ g)。該凍結乾燥品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に付し、120-150 kDaにヒトインテグリン α_4 β_7 の存在を確認した。

【0030】(ハイブリドーマの製造)上記により得られたヒトインテグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーの凍結乾燥品10 μ gを0.5 mlのPBSに溶解し、1~2週間間隔でアルメニアハムスターの腹腔内に5回注射して免疫した。

【0031】最終免疫の4日後にハムスターの脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製した。次いで、該脾細胞とマウス骨髓腫細胞P3 \times 63Ag8U.1(ATCC CRL 1597)を5:1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール(平均分子量4000)を用いて37℃で2分間反応させることにより細胞融合を行った。

【0032】細胞融合を行った細胞を96ウエルマイクロタイタープレートに植え込み、HAT培地にて37℃、5%炭酸ガス条件下で7~14日培養を行った。

【0033】次いで、増殖した細胞の培養上清についてフローサイトメトリー分析法によりスクリーニングを行った。フローサイトメトリー分析法の詳細は、以下の通りである。

【0034】160 μ lのヒトインテグリン β_7 ハイブリドーマ培養上清を二分し、半分は 2×10^5 個のRPMI 8866と共に、残り半分はヒトインテグリン β_7 を有しない 2×10^5 個のRamos細胞(ATCC CRL 1596)と共に4℃で30分間培養した。PBSで洗浄後、0.5 μ lのヤギ抗ハムスターIgG-FITC(CALTAG製)を含む50 μ lの細胞用培地中に4℃で30分間細胞を再懸濁し、そして再びPBSで洗浄した。それらを200 μ lの細胞用培地に再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。

【0035】この結果、4クローンが目的の抗原に対し陽性を示すことが判明した。

【0036】上記スクリーニング工程で得られた4クローンをそれぞれ、BALB/cマウスの胸腺細胞(約 1×10^6 個/ml)を含む細胞用培地で1個/0.2 mlとし96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに植え込んだ。37℃、5%炭酸ガス条件下で培養後7~14日で、肉眼で認められるコロニーが形成された。こうして得られたコロニーについて上記と同様にスクリーニングおよびクローニングを行い、最終的に β_7 ペプチドに対するウサギ抗血清(アメリカ、ハーバードメディカルスクール、Michael B. Brenner博士から入手)を用いてウエスタン・ブロッティングによる確認操作を行い、ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識する単クローン株を得た(120kDの β 鎖の部位に発色を認めた)。

【0037】得られた単クローン株は「抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した[受託番号、微工研菌寄第13202号(F

ERM P-13202)】。

【0038】実施例2

ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体：予め2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（ナカライテスク製）0.5 mlを腹腔内投与したBALB/cマウス（3匹）に対し、実施例1で得られた抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体（TN114）産生ハイブリドーマ（ 1×10^7 個）を腹腔内に接種した。約1週間後にハムスター抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体（TN114）を含む腹水（約3 ml/マウス）を得た。

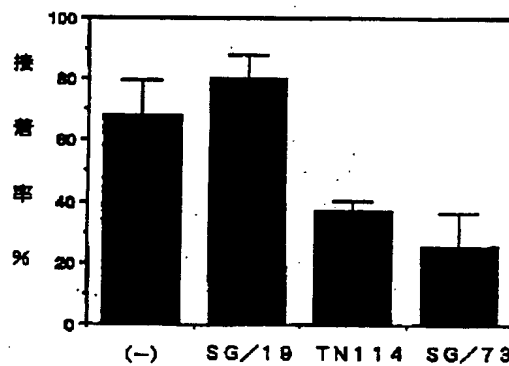
【0039】次に、得られた腹水約10 mlにPBS 20

mlを加え、4℃においてPBSで1夜透析した。これを0.2 μ mのフィルターに通した後、プロテインGセファロース4ファーストフロー（ファルマシア製）カラムで分離精製し、再び、4℃においてPBSで1夜透析し、ハムスター抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体（TN114）のPBS溶液 5 mlを得た（濃度：100 μ g/ml）。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のモノクローナル抗体（TN114）がヒトB細胞リンパ腫（RPMI8866）のフィブロネクチンに対する接着を抑制することを示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

/(C12P 21/08

C12R 1:91)

(C12N 5/20

C12R 1:91)

(72)発明者 八木田 秀雄

東京都板橋区小豆沢3丁目9番2-610号

(72)発明者 奥村 康

千葉県千葉市中央区松波1丁目14番9号